

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

WILLIAN DOS SANTOS

**FREQUÊNCIA DA MUTAÇÃO DO GENE DA PROTROMBINA E DA MUTAÇÃO
DO FATOR V DE LEIDEN EM UM LABORATÓRIO DE APOIO DA GRANDE
CURITIBA**

CURITIBA

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

WILLIAN DOS SANTOS

**FREQUÊNCIA DA MUTAÇÃO DO GENE DA PROTROMBINA E DA MUTAÇÃO
DO FATOR V DE LEIDEN EM UM LABORATÓRIO DE APOIO DA GRANDE
CURITIBA**

Artigo apresentado como requisito para
obtenção do título de Especialista em
Análises Clínicas pelo Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas
da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Drº. Railson Henneberg

CURITIBA
2016

RESUMO

A trombose e o tromboembolismo venoso constituem importantes causas de morbidade e mortalidade para a sociedade ocidental, podendo ter uma prevalência de até uma pessoa a cada mil por ano. São condições multifatoriais e estão associadas a predisposições genéticas e exposições ambientais, como gravidez, uso de contraceptivos orais, cirurgias, fraturas, imobilizações prolongadas. Dos fatores genéticos as mutações mais frequentes nestes processos trombóticos são a do gene da protrombina, que acarreta em um estado de hipercoagulabilidade devido ao aumento da concentração de protrombina e o Fator V de Leiden (FVL) que acarreta a um fenótipo de resistência à Proteína C ativada. Este trabalho realizou um estudo retrospectivo com os dados de genotipagens das mutações do gene da protrombina e do FVL de um laboratório de apoio da Grande Curitiba, e comparar os dados encontrados com a literatura. Foram analisadas as genotipagens realizadas no período de 01 de janeiro de 2014 a 22 de junho de 2015. As genotipagens foram realizadas por PCR em tempo real, e os dados utilizando-se as plataformas estatísticas Microsoft Office – Excell e pacote estatístico Prisma 6.0. Foram realizadas 1316 genotipagens no período analisado, sendo 82% do sexo feminino. A frequência genotípica encontrada para o FVL foi de 8% com a presença de pelo menos um alelo mutado e 92% com genótipo normal, e para a mutação da protrombina foi de 6% para pelo menos um alelo mutado e de 94% com genótipo normal. A frequência alélica do FVL foi de 4,29% para o alelo com a substituição e 95,71% para o alelo normal. E para a mutação da protrombina foi de 3,19% para o alelo mutado e 96,81% para o alelo normal. As frequências encontradas neste trabalho são similares às encontradas em estudos realizados em São Paulo, Recife e Minas Gerais. Os testes moleculares apesar de possuírem um alto custo são importantes para tomada de ações preventivas a eventos trombóticos no correto direcionamento dos pacientes antecipadamente a exposição de agentes ambientais com efeitos trombóticos.

Palavras-chave: Fator V de Leiden, Mutação do Gene da Protrombina, Trombose.

ABSTRACT

Thrombosis and venous thromboembolism are important causes of morbidity and mortality in Western society, and may have a prevalence of up to one person every thousand per year. They are multifactorial conditions and are associated with genetic predispositions and environmental exposures, such as pregnancy, use of oral contraceptives, surgery, fractures, prolonged immobilization. Among the genetic factors the most frequent mutations in these thrombotic processes are the prothrombin gene, which results in a hypercoagulable state due to increased concentration of prothrombin and Factor V Leiden (FVL) that leads to a phenotype of resistance to activated protein C. This study performed a retrospective study with genotyping data of mutation in prothrombin gene and FVL from a support laboratory from Curitiba, and compare with the data found in the literature. We analyzed the genotyping tests from January 1st, 2014 to June 22nd, 2015. The genotyping was performed by real-time PCR, and data using statistics platforms Microsoft Office - Excell and statistical package Prism 6.0. From the genotyping data, 1316 tests were performed during the study period, 82% female. Genotype frequency found for FVL was 8% with the presence of at least one mutated allele and 92% with normal genotype, and prothrombin mutation was 6% for at least one mutated allele and 94% with normal genotype. The allele frequency of factor V Leiden was of 4.29% for allele with the substitution and 95.71% for the normal allele. And for the prothrombin mutation was 3.19% for the mutant allele and 96.81% for the normal allele. Frequencies found in this study are similar to those found in studies carried out in São Paulo, Recife and Minas Gerais. Molecular tests despite having a high cost are important for taking preventive actions against thrombotic events in the correct direction of patients in advance the exposure of environmental agents with thrombotic effects.

Key-Words: Factor V Leiden, Prothrombin Mutation Gene, Thrombosis.

1 INTRODUÇÃO

A trombose constitui uma das causas mais comuns de morbidade e mortalidade na sociedade ocidental. Relata-se que 80% dos pacientes com diabetes mellitus morrem por trombose e 75% dessas mortes resultam de eventos cardiovasculares (SOARES, 2005). A trombose é uma doença multifatorial cuja patogênese envolve a interação entre fatores adquiridos e genéticos. Entre os últimos, mutações pontuais encontrados no gene de Fator V (G1691A ou Fator V de Leiden) e no gene de Protrombina (G20210A), estão entre as principais causas de trombose (PALOMO, 2009).

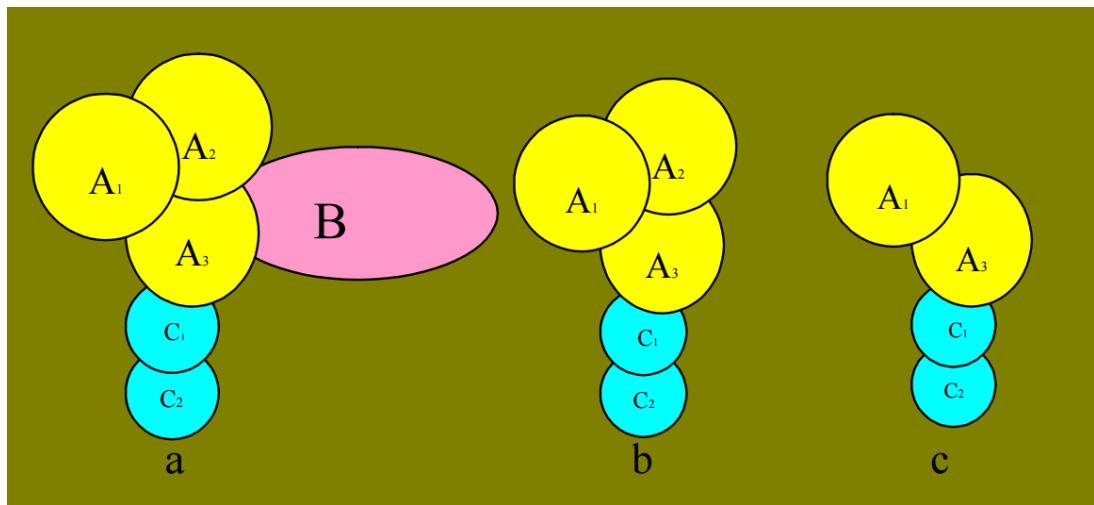
O tromboembolismo venoso é uma importante causa de morbidade que afeta cerca de uma pessoa a cada mil por ano. Durante o século XX começaram as primeiras descrições de famílias com predisposição a desenvolver eventos trombóticos (trombofilias hereditárias), onde percebeu-se não apenas uma associação ambiental de fatores de risco, mas um componente genético que influenciava o aparecimento de trombose venosa (FRANCO, 2001).

O Fator V de Leiden (FVL) está presente em 2% a 13% da população caucasiana assintomática, sendo de frequência menor ou praticamente inexistente em indivíduos afro descendentes, asiáticos e indígenas americanos. O risco relativo de trombose venosa aumenta entre 3 a 8 vezes para os portadores heterozigotos e entre 50 a 80 vezes para os homozigotos. A incidência do tromboembolismo é maior nos indivíduos que, além do FVL, sofrem de deficiências de proteínas C ou S ou outro distúrbio genético ou adquirido para trombose. No Brasil, a frequência encontrada para o FVL tem sido de 20% em pacientes com trombose venosa profunda (RAMOS, 2006).

Bertina et al (1994) demonstraram que o fenótipo de resistência à ação da proteína C ativada (PCa) estava associado à heterozigose ou homozigose para uma mutação pontual no gene do fator V (Fator V Leiden). Tal mutação consiste de uma substituição de uma guanina (G) por uma adenina (A) na posição 1691, o que acarreta a troca de uma arginina por uma glutamina na posição 506 da proteína.

Em seu estado normal, o gene do fator V traduz uma glicoproteína de 330 kDa com uma estrutura e domínios similares ao do Fator VIII → A1-A2-B-A3-C1-C2 (FIGURA 1) (MOREIRA, 2008).

FIGURA 1 - ESTRUTURA DA MOLÉCULA DO FATOR V.



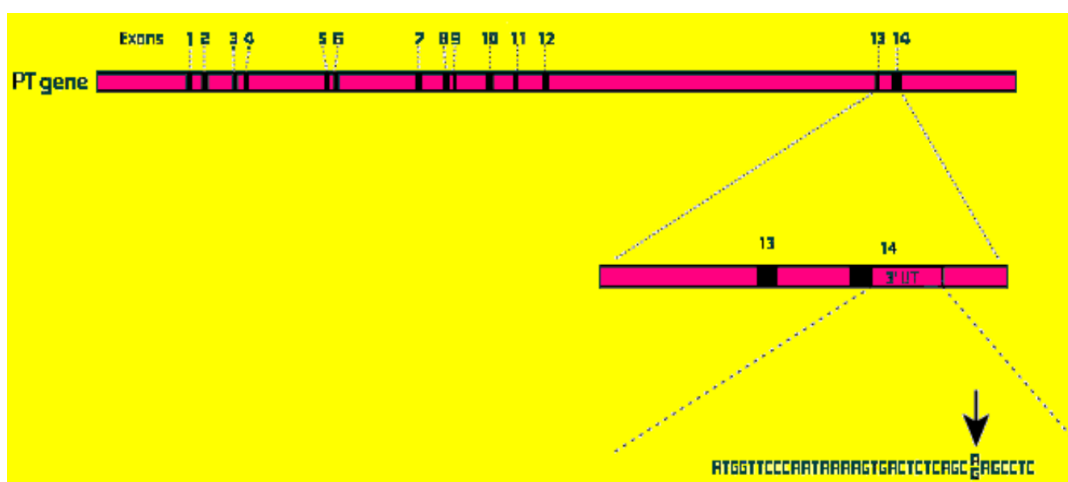
NOTA: a) Molécula do FV intacta. b) Molécula FV ativada (ativado pela trombina – FXa).
c) Molécula do FV inativada.

FONTE: NICOLAES (2002).

A inativação do Fator V pela proteína C ativada ocorre em três pontos: Arg306, Arg506 e Arg679, porém a perda completa de atividade ocorre apenas no ponto Arg306. A presença do FVL inativa o domínio de clivagem Arg506 e dificulta a inativação dos outros domínios (NICOLAES, 2002).

A mutação do gene da protrombina foi descrita pela primeira vez em 1996 (POORT et al, 1996) e é caracterizada pela substituição de G por A no nucleotídeo 20210 da região 3' não transcrita do gene da protrombina, conforme esquema na Figura 2. Esta mutação é responsável pelo aumento da concentração plasmática de protrombina, aumentando o risco de trombose em cerca de três vezes. Pode ser encontrada de 1% a 3% na população geral, podendo chegar a 6,2% em alguns estudos e até 18% em população com histórico familiar de trombose (PALOMO, 2005; FRANCO, 2001; MOREIRA, 2008).

FIGURA 2 - ESQUEMA DO GENE DA PROTROMBINA E LOCALIZAÇÃO DA MUTAÇÃO G20210A:



FONTE: MOREIRA (2008).

Eventos de tromboembolismo venoso estão na maioria das vezes associado as alterações genéticas. Este quadro levou a introdução do termo trombofilia para definir a predisposição à trombose. Vale ressaltar que a trombose trata-se de uma condição multifatorial que incluem fatores como idade avançada, imobilização prolongada, cirurgias, fraturas, uso de contraceptivos orais, gestação, condições pós-parto, neoplasias, que devem ser consideradas na avaliação de pacientes com risco trombótico (FRANCO, 2001). O presente trabalho se justifica pela importância do estudo da incidência das mutações G1691A (FVL) e G20210A (Gene da Protrombina), trazendo maior entendimento sobre os fatores de risco para as trombofilias na população brasileira.

2 OBJETIVO GERAL

Realizar um estudo retrospectivo com os dados de um laboratório de apoio na Grande Curitiba referentes às genotipagens para as mutações G1691A (FVL) e G20210A (Gene da Protrombina) no período de 01 de Janeiro de 2014 a 22 de Junho de 2015.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Calcular as frequências genotípicas e alélicas com os dados das genotipagens das mutações G1691A e G20210A, no período de 01 de Janeiro de 2014 a 22 de Junho de 2015;
- Separar as mutações G1691A e G20210A de acordo com as regiões sul, sudeste, norte, nordeste e centro-oeste do Brasil;
- Comparar com as frequências das mutações G1691A e G20210A referentes a população brasileira encontradas no estudo com outras pesquisas disponíveis na literatura.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas as genotipagens para as mutações G1691A (Fator V de Leiden) e G20210A (gene da Protrombina) realizadas em um laboratório de apoio na Grande Curitiba, no período de janeiro de 2014 a junho de 2015 consistindo de estudo retrospectivo através do acesso ao banco de dados do referido Laboratório, através dos números de pedidos identificadores para preservar a identificação dos pacientes.

As genotipagens foram realizadas através da metodologia de PCR em tempo real utilizando o equipamento Real Time PCR 7500 – Life Applied, com os kits de amplificação da Nanogen. Os ciclos de amplificação e tempos são dados internos do laboratório. Os controles de qualidades todos passados em cada rotina de realização.

As frequências genotípicas e alélicas foram realizadas utilizando-se as plataformas estatísticas Microsoft Office – Excell e pacote estatístico Prisma 6.0.

4 RESULTADOS

No período analisado, foram realizados 1316 genotipagens, para as duas mutações em estudo, sendo 1083 pedidos para pacientes do sexo feminino e 233 do sexo masculino. A distribuição percentual de acordo com o sexo e das solicitações laboratoriais estão demonstrados na Tabela 1.

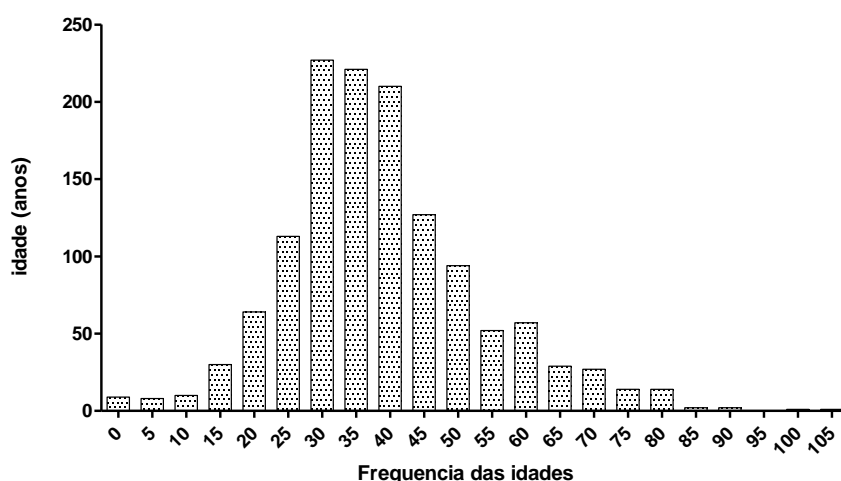
TABELA 1- DISTRIBUIÇÃO DO GÊNERO DA AMOSTRAGEM

Gênero	N	%
Feminino	1083	82,29
Masculino	233	17,71
Total	1316	100

FONTE: O AUTOR (2016)

A Figura 3 demonstra a distribuição dos pedidos médicos para as mutações estudadas de acordo com a idade. Dos pedidos solicitados, 39%, foram para pacientes entre 30 e 40 anos.

FIGURA 3 – DISTRIBUIÇÃO DA IDADE NA POPULAÇÃO ESTUDADA PARA A MUTAÇÃO DO FATOR V DE LEIDEN E DA PROTROMBINA

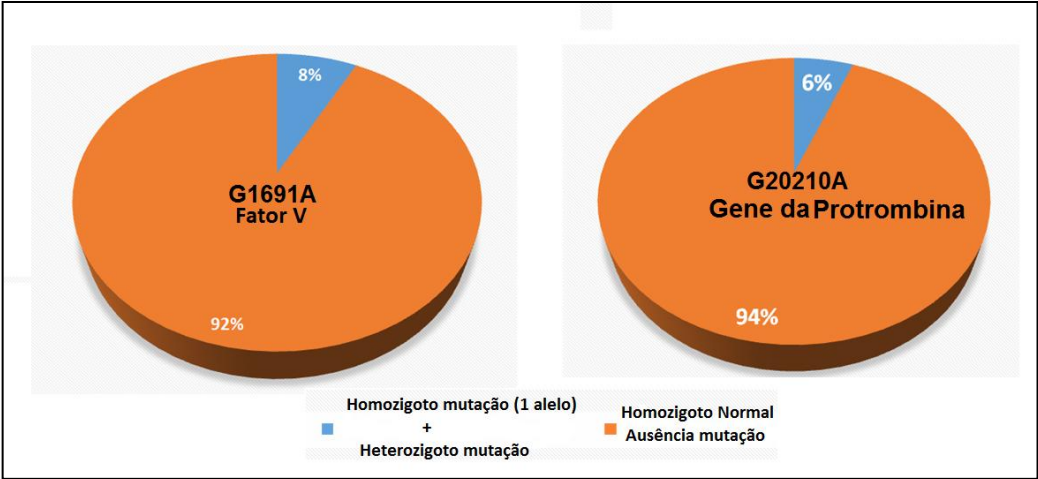


FONTE: O AUTOR (2016)

Do total de 1316 genotipagens obteve-se uma frequência genotípica para a mutação do FVL de 8% (101 indivíduos), com a presença de pelo menos um alelo

alterado. Em 1215 indivíduos (92%) não foi verificada nenhuma mutação para o Fator V. A mutação do gene da Protrombina apresentou 78 indivíduos (6%) com pelo menos um alelo com a mutação enquanto que 94% (1238 indivíduos) demonstraram ausência total da alteração nos alelos (Figura 4).

FIGURA 4 - FREQUÊNCIA GENOTÍPICA PARA AS MUTAÇÕES DO FATOR V DE LEIDEN E DO GENE DA PROTROMBINA NA POPULAÇÃO ESTUDADA.



FONTE: O AUTOR (2016)

A Tabela 2 apresenta a distribuição das frequências alélicas das mutações estudadas enquanto que a Tabela 3 distribui estas frequências de acordo com a região do Brasil onde foram solicitadas as genotipagen. A maioria das amostras solicitadas para a pesquisa das duas mutações foi solicitada na região sudeste, com 612 pedidos, enquanto que da região norte, foram solicitadas 55 pesquisas para as mutações.

TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉICAS DAS MUTAÇÕES PARA O FATOR VDE LEIDEN E PARA O GENE DE PROTROMBINA.

G1691A Fator V de Leiden		
Alelo	n	Frequência %
Normal	2519	95,71
Presença da mutação	113	4,29
G20210A Gene da protrombina		
Alelo	n	Frequência %
Normal	2548	96,81
Presença da mutação	84	3,19

FONTE: O AUTOR (2016)

TABELA 3 - DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DAS MUTAÇÕES PARA O FATOR VDE LEIDEN E PARA O GENE DE PROTROMBINA, ESTRATIFICADOS POR REGIÃO DO BRASIL.

	Mutação FVQ			
	Ausência	%	Presença	%
Sul	815	93,9	53	6,1
Centro-Oeste	137	96,5	5	3,5
Sudeste	1183	96,7	41	3,3
Nordeste	281	97,6	7	2,4
Norte	103	93,6	7	6,4
	Mutação G20210A			
	Ausência	%	Presença	%
Sul	836	96,3	32	3,7
Centro-Oeste	138	97,2	4	2,8
Sudeste	1187	97	37	3
Nordeste	280	97,2	8	2,8
Norte	107	97,3	3	2,7

FONTE: O AUTOR (2016)

A Tabela 4 demonstra a distribuição das duas mutações estudadas. A presença concomitante das duas mutações foi verificada em 15 pacientes, a presença de pelos menos um alelo mutado para o Fator V foi encontrado em 86 pacientes e para o gene da protrombina, a presença da mutação foi encontrada em 63 indivíduos.

TABELA 4 - PRESENÇA E AUSÊNCIAS DAS MUTAÇÕES G1691A E G20210A NA POPULAÇÃO ESTUDADA.

	G20210A (heterozigoto+ homozigoto)	G1691A (heterozigoto + homozigoto)	G20210A + G1691A	Normal
Presença da Mutação	86	63	15	
Ausência da Mutação				1152
Total				1316

FONTE: O AUTOR (2016)

5 DISCUSSÃO

Segundo Mota et al (2011), trombofilia hereditária:

"é o conjunto de condições genéticas que aumentam o risco de doença tromboembólica e que podem ser causadas por insuficiente inibição da cascata de coagulação, quer por mutações que resultam em deficiência dos inibidores naturais da coagulação, quer por mutações que levam ao aumento do nível/função dos fatores da coagulação" (p.127).

Entre as mutações mais frequentes na população caucasiana estão a mutação G20210A do gene da protrombina e a mutação G1691A para o Fator V, conhecido como Fator V de Leiden. Embora sejam consideradas frequentes, estas alterações muitas vezes não são investigadas ou documentadas de maneira correta, fazendo com que a pesquisa de sua presença, seja ainda insuficiente diante de sua importância (MOTA, et al, 2011).

O presente trabalho foi realizado em um Laboratório Clínico de Apoio, que atualmente recebe amostras de todas as regiões do Brasil, tendo uma rotina diversificada e numerosa em todas as áreas das análises clínicas. Através dos resultados obtidos foi possível constatar que a maioria dos pedidos para a pesquisa das duas mutações foram oriundas da população feminina (82,29%). Este dado corrobora com outros trabalhos semelhantes (RAMOS, 2006; HERKENHOFF, 2013; GUIMARAES, 2009; GOMES, 2007). Uma possível explicação para este quadro estaria relacionada a fatores ambientais de eventos trombóticos na população feminina, como o período gestacional e pós-menopausa, além do uso de contraceptivos orais (FRANCO, 2001; COUTO, 2005).

Com relação a frequência genotípica, o presente trabalho obteve uma frequência de 8% para a presença de pelo menos um alelo para a mutação do FVL, o que é semelhante à encontrada no trabalho de Herkenhoff et al,(2013) de 6% em uma população de São Paulo e mais próximo do resultado de Guimarães et al, (2009) com uma frequência de 7,8% em um estudo de Minas Gerais. Nestes dois estudos, a população estudada era composta de indivíduos com suspeitas de trombose.

O estudo de Ramos et al, (2006), na cidade de Recife, relata a frequência de 13,3%, enquanto que Mota et al, (2011) cita uma prevalência de 4 a 7% na população geral, esta frequência pode elevar-se para 21% em pacientes com

suspeita de trombose. De acordo com a literatura, a presença da mutação para o fator V de Leiden, eleva entre 3 a 80 vezes o risco de desenvolvimento de episódios trombóticos devido à presença da resistência a PCa, com probabilidade de recorrência de um evento trombótico de 3,6% dentro de um ano (HERKENHOFF, 2013; GUIMARAES, 2009; MOREIRA, 2008).

Para a mutação do gene da protrombina a frequência encontrada foi de 6% para pelo menos um alelo mutado, o que representa o dobro da frequência do estudo de Herkenhoff et al, (2013) que relatam a frequência de 3%. Resultados semelhantes foram encontrados por Guimarães et al, (2009) (6,1% de frequência) e Mota et al, (2011) (0,7 a 4% de frequência em população geral. Com relação a mutação do gene da protrombina, sua presença aumenta o risco de trombose em até 3 vezes (PALOMO, 2005).

As frequências alélicas encontradas para as mutações G1691A e G20210A são semelhantes as frequências encontradas em outros estudos já publicados (HERKENHOFF, 2013; GUIMARAES, 2009, MOTA, 2011). No presente trabalho, com a estratificação dos dados por região brasileira, foi possível verificar que a região Sul e a região Norte apresentaram as maiores frequências para o FVL enquanto que a região Sul apresentou a maior frequência para a mutação G20210A (HERKENHOFF, 2013; GUIMARAES, 2009, MOTA, 2011).

A presença concomitante das duas mutações na forma homozigota foi encontrada em 6 pacientes o que pode indicar um mau prognóstico e a necessidade de aumento dos cuidados preventivos futuros eventos trombóticos, devido aos efeitos cumulativos das duas mutações (TABELA 5) (HERKENHOFF, 2013; GUIMARAES, 2009, MOTA, 2011).

Apesar de não ser indicado o rastreio das trombofilias hereditárias em pacientes assintomáticos conforme indicação do British Committee for Standards in Haematology de 2010, a identificação da presença destas mutações pode levar a uma precaução adicional a estes indivíduos no momento de expô-los aos riscos ambientais como grandes cirurgias, gravidez, imobilização prolongada, viagens longas. Podendo assim permitir o desenvolvimento de estratégias profiláticas à trombose primária em indivíduos com histórico familiar e consequentemente na população em geral (MOTA, 2011).

6 CONCLUSÃO

Foi possível constatar que as frequências encontradas nos dados retrospectivos deste estudo foram compatíveis com dados bibliográficos. A amostragem selecionada demonstrou que a maioria dos pedidos médicos que solicitam estas duas pesquisas são oriundas de indivíduos do sexo feminino, o que poderia ser explicado por fatores como às predisposições associadas ao gênero.

Apesar de serem testes laboratoriais de alto custo, a genotipagem destas duas mutações auxilia fortemente nas tomadas de ações preventivas à eventos trombóticos e correto direcionamento de pacientes antecipadamente à exposição de agentes ambientais com efeito trombótico.

É importante salientar que mais estudos epidemiológicos e de rastreio para a pesquisa destas mutações são necessários para melhoria dos conhecimentos sobre o tema, aumentando as alternativas de prevenção de eventos assintomáticos.

REFERÊNCIAS

BERTINA, R.M.; KOELEMAN, B.P.; KOSTER, T.; ROSENDAL, F.R. et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. **Nature**. 369(6475):64-67, 1994.

COUTO, E.; NOMURA, M.L.; BARINI, R.; PINTO E SILVA, J.L. Pregnancy-associated venous thromboembolism in combined heterozygous factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations. **São Paulo Med. J.** 123(6):286-288, 2005.

FRANCO, R.F. Trombofilias hereditárias. **Medicina, Ribeirão Preto**. 34:248-257, 2001.

GOMES, R; NASCIMENTO, E.F.; ARAÚJO, F.C. Por que os homens buscam menos os serviços de saúde do que as mulheres? As explicações de homens com baixa escolaridade e homens com ensino superior. **Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro**. 23(3):565-574, 2007.

GUIMARAES, S.P.; SOARES, J.B.B.; OLIVEIRA, V.C.; PARDINI, V.C.; FERREIRA, A.C.S. Mutações predisponentes à trombofilia em indivíduos de Minas Gerais – Brasil com suspeita clínica de trombose. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**. 31(1):19-24, 2009.

HERKENHOFF, M.E.; GAULKE, R.; REMUALDO, V.R.; ROSA, C.A.V.L. Analysis of factor V Leiden and prothrombin mutations in patients with suspected thrombophilia in São Paulo state – Brazil. **J. Bras. Patol. Med. Lab**. 49(3):169-173, 2013.

MOREIRA, ANALICE MARQUES. Influencia do fator V de Leiden e da mutação G20210A no gene da protrombina no desenvolvimento de eventos trombóticos no município de Fortaleza.05/09/2008. 104p. **Dissertação** – Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2008

MOTA, F.; GONÇALVES, L.R.; MANSILHA, A. Rastreio de trombofilia hereditária no contexto de trombose venosa profunda. **Angiologia e Cirurgia Vascular**. 7(3):126-137, 2011.

NICOLAES, G.A.F.; DAHLBÄCK, B. Factor V and Trombotic Disease. Description of a Janus-Faced Protein. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol**. 22(4):530-538, 2002

PALOMO, I. et al. Factor V Leiden y mutación de la protrombina G20210A en pacientes con trombosis venosa y arterial. **Rev. Méd. Chile**. 133:1425-1433, 2005.

PALOMO, I; SEGOVIA, F.; DANIELA PARRA, D.; ALARCÓN, M. ROJAS, E. Low prevalence of Factor V Leiden and the prothrombin G20210A mutation in a healthy population from the central-south region of Chile. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**.;31(3):143-146, 2009.

RAMOS, C.P.S; CAMPOS, J.F.; MELO, F.C.B. NEVES, W.B.; SANTOS, M.E.; ARAÚJO, F.A.; MELO, R.A.M. Frequency of factor V Leiden in individuals under thrombophilia investigation, Recife, Pernambuco, Brazil. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** 28(2):131-134, 2006.

SOARES, A.L. et al. Avaliação da incidência das mutações G1691A no gene do fator V (fator V Leiden) e G20210A no gene da protrombina em pacientes com diabetes mellitus tipo 2. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** 27(3):192-196, 2005.

POORT, P.; ROSENDAAL, F.R.; REITSMA, P.H. et al. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase venous thrombosis. **Blood**, 88(3): 668-670, 1996.